원 저

대한신경과학회지 20(3):223~226, 2002 ISSN 1225-7044

허혈성 뇌졸중에서 Mean Platelet Component를 이용한 활성혈소판 측정
- 예비연구-

건양대학교 의과대학 신경과학교실, 임상병리학교실* ,
연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 신경과학교실 **

김돈수 유승화 이종욱* 김용덕 최영철**

Mean Platelet Component to Measure Platelet Activation in Ischemic Stroke
-Preliminary Study-

**Don-Soo Kim, M.D., Seung-Hwa Ryu, M.D., Jongwook Lee*, M.D. ,
Yong-Duk Kim, M.D.and Young-Chul Choi**, M.D.**

Department of Neurology and Clinical Pathology, Konyang University Hospital,
Department of Neurology, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine***

Background : Abnormal platelet activation has been identified in several disorders characterizedby vascular pathology including coronary artery disease, Alzheimer disease, myeloproliferative disorders, diabetes, preeclampsia, inflammatory bowel disease and glomerular disease. Antiplatelet therapy has been valuable in the management of some of these conditions. The aim of this study is to verify usefulness of mean platelet component (MPC) concentration as a marker of thrombotic process in patients with cerebral infarction. Our hypothesis is that MPC as measured by the ADVIA^{R} 120 hematology system is used to detect and monitor platelet activation associated with thrombotic process of ischemic stroke. **Methods** : To study the existence of platelet activation at the onset of cerebral infarction, mean platelet concentration of platelets were measured daily during post-stroke 10 days. Thirty-four acute thrombotic cerebral infarction and seventeen age-matched healthy persons were selected for this study. To investigate the time course of the platelet MPC changes observed in stroke patients, the blood samplings for MPC measuring were done and analyzed on the ADVIA 120^{R} system. **Results** : There was a statistically significant decrease in MPC concentration of the platelets at post-stroke 3rd to 7th day compared to the control group ($p<0.05$). **Conclusions** : We conclude that a reduction of MPC as measured by the ADVIA 120^{R} hematology system may be used to detect and monitor thrombotic process associated with platelet activation in ischemic stroke.
J Korean Neurol Assoc 20(3):223~226, 2002

Key Words : Mean platelet component(MPC), Stroke, Platelet activation

서 론

혈소판은 혈액내에 존재하며 여러 생리학적인 자극에 의해 혈소판 응집을 초래하는데, 이러한 변화는 혈관의 혈전색전성 질환의 혈전형성에 중요한 역할을 한다. 혈소판의 활성화는 혈전성질환의 공헌요소이며, 이러한 비정상적인 혈소판 활성화는 급성 심근경색,[1-3] 뇌혈관질환,[2,4] 염증성 장질환,[5] 당뇨병,[6,7] 임신중독증,[8] 알쯔하이머병[9] 등 여러 질환에서도 보인다.

급성 뇌혈관질환에서 혈소판 활성화의 연구를 위해 광학 및 전자현미경을 이용한 형태학적인 분석연구는 혈전성 뇌졸중이나 동맥경화증 환자에서 시행되었는데, 추벽(folds), 위추벽(pseudofolds), 구상화(ballooning), 알파입자의 감소 등 혈소판의 형태학적 변화를 손상된 혈관벽으로부터 얻어진 혈소판에서 보고하였다.[10] 그러나 이러한 혈소판의 형태학적인 변화는 기존의 동맥경화증 환자에서 활성화된

Manuscript received September 5, 2001.
Accepted in final form March 13, 2002.
* Address for correspondence
Young-Chul Choi, M.D., Ph.D.
Department of Neurology, Yongdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine
146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul 220;-050 Korea
Tel : +82-2-3497-3323 Fax : +82-2-3462-5904
E-mail : ycchoi@yumc.yonsei.ac.kr

Table 1. Mean platelet component concentration in the patients with ischemic stroke and control group.

Ischemic stroke patients (n=34)	MPC value (g/dl)
After 1st day	29.60±0.66
2nd day	29.22±1.26
3rd day	28.68±1.50*
4th day	28.28±2.05*
5th day	28.38±1.49*
6th day	28.49±1.68*
7th day	28.25±1.92*
8th day	28.95±1.05
9th day	28.74±1.40
10th day	28.74±1.30
Control groups (n=17)	29.46±0.43

* statistically significant between stroke patients and control groups (p value < 0.05)

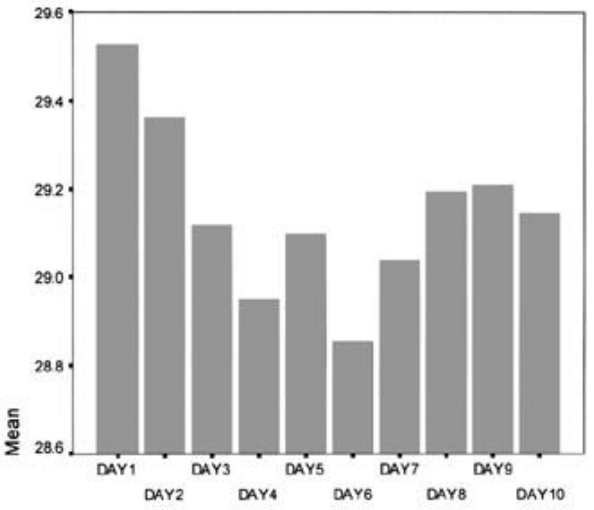

Figure 1. Serially checked mean platelet component during post-stroke 10 days

이상 혈소판과 혈전성 뇌졸중 발생시의 활성 혈소판이 혼합되어 나타난 복합적이며 정성적인 것이므로 급성 뇌졸중의 생물학적 지표로 사용하기는 힘들다.[4] 또한 최근 beta thromboglobulin, platelet factor-4 등이 혈소판 활성화의 지표로서의 이용가치를 주장한 연구[10,11]도 있으나 현실적으로 비용과 시설이 필요해서 임상에서 쉽게 응용하기 힘들다.

그러므로 저자 등은 이러한 질환에서 혈소판 활성도를 측정하는 것이 환자의 현재 급성질환의 진행상태나 치료의 중단시기 등을 정하는 지표가 될 수 있다는 가설을 설정하였으며, 급성관상동맥질환에서 조기진단을 목적으로 사용된 적 있는[1] ADVIA 120® system을 이용한 Mean platelet component(MPC) 측정방법을 이용하여 급성 뇌경색 환자의 혈소판활성화의 지표로서 MPC를 정량적으로 측정함으로써 급성뇌졸중 질병진행과정의 지표를 찾고자 하였다.

대상과 방법

1. 환자군과 대조군

건양대학교병원 신경과에 2001년 3월부터 5월까지 입원한, 발병 24시간 내의 34명 급성 혈전성 뇌경색 환자와 정상 대조군 17명을 대상으로 하였다. 환자군은 34명(남자 20명, 여자 14명)으로 연령은 62.14±12.34세였으며, 증상 발생 시각은 신경학적 결손이 없는 상태를 확인한 마지막 시간으로 하였다. 뇌경색의 원인별 분류로는 TOAST (Trial of Org 10172 Acute Stroke Treatment) 분류를 사용하여,[12] 분류상 심색전증(cardioembolism), other determine와 undetermined 아형은 제외하였다. 이 연구의 목적이 혈전성 뇌졸중환자의 병인에 있어서 활성혈소판의 역할을 규명하는 것이기 때문에 심방세동 및 심장병의 병력이 있는 뇌경색 환자나 뇌전산화단층촬영 소견상 색전성 뇌경색을 시사하는 소견이 있는 환자는 제외하였다. 색전성 뇌졸중 환자에서는 항응고제를 사용하기 때문에 연구결과에 영향을 미쳐 본 연구의 목표와 부합되지 않았기 때문이다. 또한 중증 뇌졸중에 동반되는 여러 영향을 배제하기 위해 National Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS[13]) 10점 이하인 경우의 경증 뇌졸중 환자만을 대상으로 하였으며, 연구과정 중 칼슘 길항제나 항고혈압제제를 사용한 환자, 그리고 위험인자 중 당뇨병을 가진 환자도 제외하였다. 모든 환자에서 신경학적 검사와 뇌전산화단층촬영 또는 뇌자기공명영상촬영을 시행하였다. 정상 대조군은 본원 건강검진센터에 건강검진을 목적으로 내원한 성인 중 신경학적 검사상 이상이 없고 뇌졸중과 심장질환의 기왕력이 없으며, 나이와 성별이 통계적으로 환자군과 유의한 차이가 없는 사람 중 무작위로 선정하였다.

2. Mean platelet component study[14-17]

혈소판이 활성화되면 혈소판에서 세포 외로 많은 물질들이 방출되며 이는 면역형광 유량세포계(flow cytometry) 방법에 의해 측정되어질 수 있다. 이와 달리 Bayer ADVIA 120® system은 레이저광의 산란현상을 사용하여 혈소판의 크기와 굴절률을 동정하기 때문에 크기가 큰 혈소판이나 적혈구 조각들과의 감별이 정확하게 이루어짐이 밝혀졌다. 이러한 이차원적인 혈소판분석은 적혈구 분석과 함께 이루어 지는데, 혈액희석 후에 혈소판과 적혈구는 670 nm의 레이저diode에 의해 투과된다. 이후 생기는 광산란 신호가 low angle-high gain(plat x)과 high angle-low gain(plat y)값으로 얻어진다. 이는 Mie가설의 광산란 계산식에 의해 정량적 수치나 굴절율로 변환된다. 이러한 통합분석은 혈소판, 적혈구, 적혈구 조각들, 유령적혈구 세포를 감별하기 위해 사용되며, 혈소판 크기주도표(volume histogram)는 x축은 high angle light scatter로서 표현되고 y축은 low angle light scatte로 표시된다. 이 결과 Mean platelet component concentration은 혈소판굴절률에 의해 0~40 g/dl의 수치로 얻어진다. 혈소판 활성화는 혈소판의 형태변화와 과립방출 정도와 비례하기 때문에 MPC 수치의 감소는 활성혈소판의 증가를 의미한

다. 이미 여러 연구에서는 혈소판 활성화의 정도와 MPC의 역상관 관계가 규명되었다. 또한 Platelet component distribution width(PCDW)도 혈소판 형태변화의 척도이므로 혈소판 활성화를 반영한다. 뇌경색 환자군의 혈액표본은 응급실 내원 당시에 추출하였고, 혈소판응집력은 아침에 현저히 증가하기 때문에 이후 매일 아침 공복상태에서 추출하여 10일간 매일 검사하였다. 모든 환자는 누워있는 상태에서 21게이지 바늘을 사용하여 전주와정맥을 통하여 4.5 ml의 양을 추출하여 환자의 전혈을 Citrate Theophylline Adenosine Dipyridamole(CTAD) 튜브에 담아 1시간내에 ADVIA 120^{R} system을 이용하여 MPC를 측정하였다. 1시간 이내의 검체 처리는 Ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)나 CTAD 처리에 따라 결과의 차이가 없다18고 알려져 있지만 결과의 정확성을 위해 CTAD만을 사용하여 검사를 시행하였다.

3. 통계

모든 자료는 평균±표준편차로 기술하였다. 두 군간의 평균값의 차이를 비교하기 위하여 Student-T test와 Mann-Whitney test를 시행하여 유의한 차이를 모수적, 비모수적 검정을 동시에 시행하였다. P값의 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결 과

환자군의 뇌병변의 위치는 우측 8명, 좌측 15명, 양측 11명이었다. 급성 뇌경색병변은 천막상부에 24명, 천막하부에 10명이 있었다. 연구결과 정상 대조군 17명의 MPC값은 29.46±0.43 g/dl였으며, 뇌경색증 발생 후 매일 검사한 수치는 발병 후 1~2일에는 유의한 차이가 없었으나, 3~7일간에 걸쳐 유의한 정도의 수치 감소가 관찰되었다($p<0.05$, Table 1). 또한 발병 후 8~10일 후에는 다시 점진적으로 증가하여 정상 대조군과의 유의한 차이가 없는 수치로 상승하였음을 알 수 있었다(Fig.1).

고 찰

오랫동안 혈소판은 단순히 혈전증과 항상성에 관여하는 세포질 조각으로만 인식되었으나, 최근 이들은 염증성 반응에 중요한 역할을 함이 밝혀졌다. 활성혈소판은 여러 가지 물질을 분비하여 많은 수의 호염기구, 비만세포, 호중구의 강력한 증폭기능을 유발하는 것으로 알려졌는데, 이러한 것들로는 platelet factor 4, beta thromboglobulin, platelet derived growth factor, histamine releasing factor 등이다.[10,11,19] 또한 염증성 반응과 관련하여 oxygen free radical, platelet activating factor, thromboxane, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, serotonin platelet factor 4, transforming growth factor beta, nitric oxide 등이 있다.

비정상적인 혈소판 활성화의 경우는 관상동맥 폐색증과 같은 급성 심근질환, 급성 뇌졸중, 골수증식성 질환, 임신중독증, 염증성 장질환, 사구체질환,[21] 당뇨병 등에서 혈전형성과정이 발생하여 환자의 상태를 악화시키는 것으로 알려져 있고 이러한 질환들에 있어서 항혈소판 제재의 투여가 치료방법으로 알려져 있다. 또한 수술시 체외혈액순환, 혈액투석 등도 또한 혈소판 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구들은 이러한 질환들에 있어서 선별검사로서의 MPC의 유용성을 주장하고 있으나 다른 여러 가지 질환들에 있어서 MPC의 광범위한 연구가 이루어지지 않았기 때문에 임상적 유용성은 아직 밝혀지지 않았다. 새로이 개발된 Bayer ADVIA 120^{R} system은 이전의 다른 검사와는 다르게 전혈을 이용하여 검사하는 방법으로 활성혈소판에 대한 정보를 얻을 수 있다.[22]

이전의 연구에서 뇌졸중 환자의 혈소판에서 과립방출이 되는 것을 전자현미경으로 증명하였으나, 이는 고혈압 환자에서도 발견되어 혈소판 활성화가 급성 뇌경색에 의해서 발생한 것이 아니라 기존의 동맥경화과정에 의해 활성화가 유도되어 있었다고 주장하였다.[10] 그러나 이 연구의 제한점은 활성혈소판의 정량적 검사가 아니라 정성적 검사라는 것이다. 본 연구의 경우 MPC가 과립을 방출한 활성혈소판의 양을 측정하는 검사이기 때문에 정량적으로 혈전형성 활성도의 상관관계를 규명하는데 이전의 다른 검사보다 객관적이다. 병전 상태의 혈소판 활성화 정도를 알 수 없지만 질환 발생 후 추적 관찰함으로써 MPC값의 감소 후 상승을 규명함으로써 급성뇌졸중과 연관된 혈전형성과정과의 상관관계를 추정할 수 있었다. 본 연구의 결과는 급성 혈전성 뇌경색증 환자에서 발병 후 3~7일 사이의 급성기에 일과적인 혈소판 활성화가 발생하고 급성기가 경과함에 따라 활성혈소판이 감소함을 알 수 있었다. 일반적으로 급성뇌졸중 환자에서 혈소판수치가 감소된다는 보고[23]가 있지만 혈소판의 수와 MPC와는 무관하므로 혈소판 감소만으로 MPC의 감소를 설명하기는 어렵다.

이는 MPC가 정량적인 수치로서 급성뇌졸중 증세 발생 후에도 혈전형성과정이 급성기와 아급성기를 거쳐 계속 진행된다는 것을 시사하는 소견으로써 급성뇌졸중에서의 혈소판 활성화는 뇌졸중의 발병 전 원인이 아니라 이후의 진행과정을 반영한다고 생각된다. 그러므로 MPC의 결과를 지속적으로 관찰함으로써 뇌졸중의 급성기와 아급성기의 종료를 판단하는 지표로 사용할 수 있을 것으로 주장하며 여러 급성기 약물치료의 지표로서의 임상적 의의를 가질 것으로 생각한다.

본 연구는 예비연구인 만큼 몇 가지 제한점을 가지고 있는데, 그 중 중요한 것은 이미 기술한 바와 같이 고혈압 등의 위험인자를 가진 군에서의 뇌경색 발병전 혈소판 활성화 상태에 대한 비교연구가 시행되지 않았다는 것이다. 추후 연구에서는 위험인자군을 포함한 여러 군간의 비교연구가 광범위하게 시행되어야 할 것이며, 본 연구는 환자군에서 급성 뇌경색증 발병 시 혈소판 활성도의 변화추이를 알 수 있다는 데 의미를 두어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 저자 등의 연구는 ADVIA 120^{R} system을 이용하여 MPC를 측정함으로써 혈소판 활성화의 변화를 정량적으로 측정할 수 있으며 급성 허혈성 뇌경색 환자에서

추적 관찰시 혈전형성과정을 감시할 수 있다는 것이다. 추후 항혈소판 제재나 새로운 혈소판 억제재를 사용한 군에서의 추가 연구가 진행된다면 급성 허혈성 뇌졸중 환자의 치료제 투여기간과 급성진행정도를 평가하는데 보조적인 도움이 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Ichiro K, Hisao O, Hirofumi S, Keiji T, Shinzo M, Tomochiro, et al. The prognostic value of small- sized platelet aggregates in unstable angina:Detection by a novel laser-light scattering method. *Thromb Res* 2001;101:109-118.
2. Anti-platelet Trialists' Collaborative Study. Collaborative over-view of randomized trials of antiplatelet therapy I:Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* 1994;308:81-106.
3. Knight CJ, Panesar M, Wright C, Clarke D, Butowski PS, Patel D, et al. Altered platelet function detected by flow cytometry. Effects of coronary artery disease and age. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2044-2053.
4. Hideo T, Shu K, Satoshi T, Daizo K, Ryushi K, Hiroaki T. Activated coagulation/fibrinolysis system and platelet function in acute thrombotic stroke patients with increased C-reactive protein levels. *Thromb Res* 2000;100:373-379.
5. Corash L, Tan H, Gralnick H. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. 1. Relationship between buoyant density, cell volume, and ultrastructure. *Blood* 1977;49:71-87.
6. Anna BS, Cezary W. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50:1-16.
7. ETDRS Investigators. Aspirin effects on mortality and morbidity in patients with diabetes mellitus. Early treatment diabetic retinopathy study report 14. *JAMA* 1992;268:1291-1300.
8. Sibai BM, Caritis SN, Thom E. The national institute of child health and human development network of maternal fetal medicine units. Prevention of preeclampsia with low dose aspirin in healthy nulliparous pregnant woman. *N Engl J Med* 1989;329:351-356.
9. Davies TA, Long HJ, Tibbles HE, Sgro KR, Wells JM, Rathbun WH, et al. Moderate and advanced Alzheimer's patients exhibit platelet activation differences. *Neurobiol Ageing* 1997;18:155-162.
10. Hitoshi K, Junichi T, Takuji N, Kazuo K. Posssible existence of platelet activation before the onset of cerebral activation. *Atherosclerosis* 2000;153:203-207.
11. Deuel TF, Senior RM, Chang D. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4584-4587.
12. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappele J, Biller J, Love BB, Gorden DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke* 1993;24:35-41.
13. Brott T, Adams HP, Olinger CP, Marler JG, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989;20:864-70.
14. Paul H, Allan H, Donna G, Carol B, Sam M. Immunoplatelet counting : a proposed new reference procedure. *Br J Haematol* 2000;108:228-235.
15. Chapman ES, Hetherington EJ, Zelmanovic D. A new method for measuring platelet activation state. *Transfus Med* 1998;8:277-278.
16. Brummitt DR, Barker HF. The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIA 120 full blood count analyzer. *Clin Lab Haematol* 2000;22:103-107.
17. Macey MG, Carty ER, Newland AC. The use of the ADVIA 120 haematology system to monitor inhibitors of platelet activation. *Br J Haematol* 1999;105:96-97.
18. Chapman ES, Kling G, Canfield W, Zelmanovic D. Stability of various anticoagulated whole blood specimens for use in ex vitro platelet activation measurement. *Blood* 1999;10:94-99.
19. Wahl SM, Hunt DA. Wakefield LM. Transforming growth factor type beta induces monocytes chemotais and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;63:943-945.
20. Okada M, Sagawa T, Tominaga A, Kodama T, Hitsumoto Y. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumor cells : one cyclooxygenase dependent and the other nitric oxide dependent. *Immunology* 1996;89:158-164.
21. Barnes JL. Platelets in glomerular disease. *Nephron* 1997;77:378-393.
22. Macey MG, Carty ER, Chapman ES, Zelmanovic D,Okrongly D, Rampton DS, Newland AC. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry* 1999;38:250-255.
23. D'Erasmo E, Acca M, Celi FS, Medici F, Palmerini T, Pisani D. Plasma fibrinogen and platelet count in stroke. *J Medicine* 1993;24:185-191.